

Regulacyjna sieć sygnałów redoks w komórkach roślinnych wykrywa każdą nierównowagę metaboliczną i moduluje odpowiedź na poziomie transkrypcji i translacji. W ten sposób rośliny szybko przystosowują się do zmieniających się warunków środowiska, co daje możliwość produkcji nasion dobrej jakości. Regulacja stanu redoks zachodzi już w trakcie rozwoju nasion i jest ściśle powiązana z utrzymaniem przez nie żywotności w czasie ich długoterminowego przechowywania, podczas którego nasiona wszystkich kategorii starzeją się. Biorąc pod uwagę stopień odwodnienia w czasie dojrzewania i warunki przechowywania wyróżnione zostały trzy kategorie nasion: orthodox (tolerujące podsuszanie <7% wilgotności i przechowywanie w temperaturze -10°C), recalcitrant (nie tolerujące podsuszania poniżej 27% i przechowywania metodami tradycyjnymi) i intermediate (tracące stosunkowo szybko żywotność w porównaniu z nasionami orthodox). Ponieważ tempo procesu starzenia nasion jest różne dla każdej z kategorii, dlatego dla skutecznej ochrony zasobów genowych konieczne jest poznanie przyczyn oraz przebiegu procesu starzenia nasion cechujących się różną wrażliwością na podsuszanie i długoterminowe przechowywanie. Badania prowadzone są w dyscyplinie nauk biologicznych i leśnych. Celem badań jest analiza wpływu regulacji stanu redoks, ze szczególnym uwzględnieniem aktywności białek Trx (tiodredoksyny), TrxR (NADPH-zależna reduktaza tiodredoksyn) i Prx (peroksyredoksyny), na żywotność nasion różniących się wrażliwością na utratę wody i należących do trzech kategorii. Regulacja stanu redoks odbywa się poprzez udział Trx oraz TrxR w procesie S-nitrozylacji i denitrozylacji białek. Białka Trx uczestniczą również w regulacji aktywności Prx. System Trx/TrxR/Prx zaangażowany jest także w proces detekcji oraz transdukcji sygnału stresu i uczestniczy w adaptacji tkanek roślinnych do warunków środowiska. Spodziewamy się, że zaplanowane w projekcie doświadczenia umożliwią weryfikację 3 hipotez: 1° Białka Trx/TrxR oraz Prx (zidentyfikowane przez nas w nasionach drzew) współdziałają w regulacji stanu redoks w nasionach kategorii orthodox, recalcitrant i intermediate w okresie przed i po zbiorze. Najwyższa aktywność systemu Trx/TrxR/Prx obserwowana jest w nasionach odpornych na podsuszanie, które mogą być przechowywane długoterminowo (orthodox). 2° Regulacja stanu redoks z udziałem systemu Trx/TrxR/Prx zachodzi już na etapie rozwoju i dojrzewania nasion i ma wpływ na utrzymanie ich żywotności po zbiorze, w czasie przechowywania. 3° Tempo starzenia się nasion w czasie przechowywania zależy od aktywności systemu Trx/TrxR/Prx w czasie przechowywania i ma związek z intensywnością oddychania nasion oraz akumulacją NO na terenie komórki. Materiał badawczy stanowią nasiona gatunków drzew, zróżnicowane pod względem wrażliwości na utratę wody. Nasiona klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L., kategoria orthodox) tolerują podsuszanie <7% wilgotności i przechowywanie w temperaturze -10°C, nasiona klonu jaworu (*Acer pseudoplatanus* L., kategoria recalcitrant) nie tolerują podsuszania poniżej 27% i przechowywania metodami tradycyjnymi, nasiona buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L., kategoria intermediate) tracą stosunkowo szybko żywotność w porównaniu z nasionami orthodox. Dla dokładnego opisu sieci wzajemnych interakcji pomiędzy zachodzącymi procesami wpływającymi na stan redoks, analizy są wykonywane w 10-15 terminach, reprezentujących różne stadia rozwojowe w trakcie dojrzewania nasion i w nasionach dojrzałych podczas przechowywania w warunkach optymalnych oraz przyspieszonego starzenia, a także w czasie kiełkowania. Chcąc zrealizować główny cel badań i zweryfikować postawione hipotezy, w projekcie wykonywane są analizy: 1) ocena żywotności nasion (test kiełkowania wg. ISTA); 2) identyfikacja białek tiodredoksyn (Western blot, elektroforeza 2DE-SDS-PAGE); 3) analizy aktywności TrxR oraz GSNOR (metody spektrofotometryczne, immunoblotting); 4) analiza poziomu ekspresji genów kodujących białka Trx, TrxR oraz GSNOR (RT-PCR oraz qPCR); 5) analiza identyfikacji białek docelowych związanych z Trx (chromatografia powinowactwa, spektrometria mas); 6) analizy poziomu i lokalizacji tlenu azotu oraz nadtlenoazotynu (pomiar fluorescencji, lokalizacja -mikroskop skaningowy CLSM); 7) analizy ogólnej zawartości tioli oraz ogólnej zawartości białek S-nitrozolowanych (metody spektrofotometryczne oraz elektroforeza SDS-PAGE); 8) identyfikacja białek, które uległy procesowi nitrozylacji i denitrozylacji (elektroforeza 2D-

SDS-PAGE, spektrometria mas); 9) analiza intensywności oddechowej nasion (aparat Seahorse XF ExtracellularFlux); 10) analiza uszkodzeń oksydacyjnych DNA w nasionach (pomiar ilości 8-oksoG za pomocą testu typu ELISA); 11) analizy statystyczne wyników (ANOVA, test Tukey'a). Proponowane badania mają charakter unikatowy, są ponieważ w przeciwieństwie do znaczącej większości dostępnych opublikowanych analiz, będą prowadzone w sposób kompleksowy z wykorzystaniem nasion trzech kategorii, różniącymi się właściwościami fizjologicznymi (proponowane badania nie są ograniczone tylko do nasion typu orthodox). Tylko tego typu badania mogą dostarczyć odpowiedzi na temat regulacji stanu redoks w nasionach i wpływu tej regulacji z okresu ich rozwoju na żywotność podczas przechowywania, definiującą ich jakość i przydatność jako materiał siewny. Należy zaznaczyć że wiele gatunków roślin ważnych z ekologicznego i ekonomicznego punktu widzenia produkuje nasiona typu nie-orthodox (np. dęby, klony, buki, topole, drzewa cytrusowe, awokado). Do analiz wykorzystane zostaną techniki biologii molekularnej i enzymologii co będzie miało znaczenie w dyscyplinie nauk biologicznych i leśnych, znaczenie dla rozwoju nasiennictwa oraz przybliży nas do zdefiniowania nowych markerów żywotności nasion opartych na nowoczesnych technikach.